

1. Problemstilling og formål

Alger er havets grønnsaker, og interessen for alger som mat er økende i hele Europa. Mye av denne interessen skyldes høyt innhold av en rekke næringsstoffer og virkestoffer, samt fokus på ny mat med lavt «karbon fingerprint». Alger kan også ha enkelte utfordringer i forhold til mattrygghet, da de kan inneholde høye konsentrasjoner av jod, uorganisk arsen og kadmium. Et annet metall som er aktuelt i forbindelse med taredyrking i nærheten av lakseoppdrett er kobber, ettersom kobber brukes som antibegroingsmiddel i merder.

Delarbeidspakke 1.1. Validering av arsen-spesieringsmetode til spesifikk bestemmelse av uorganisk arsen i alger

Arsen er et element som finnes naturlig i høyere konsentrasjoner i marine prøver sammenlignet med terrestriske prøver. Arsen finnes i mengde forbindelser, både vannløselige og fettløselige, og organiske og uorganiske forbindelser. Uorganisk arsen er karsinogent og kan føre til ulike typer kreft, blant annet i lunger, hud og nyre (EFSA 2009). I 2009 publiserte EFSA en vitenskapelig opinion på arsen i mat i 2009, der det ble estimert at inntaket av uorganisk arsen i en voksen populasjon er høy og i området av BMDL₀₁ (0.3 til 8 µg/kg kroppsvekt per dag) for kreft i lunger, hud og nyre, samt hudlesjoner. I 2014 oppdaterte EFSA eksponeringsestimatet, og de oppdaterte estimatene var lavere, men fremdeles i området av BMDLs (EFSA 2014). Matvarer som f.eks. korn, ris og drikkevann er kilder til uorganisk arsen. Fisk og sjømat er også ansett som kilder som bidrar til eksponering av uorganisk arsen (EFSA 2009).

For uorganisk arsen, er det maksimumsgrenser for ris og risprodukter (EU 1881/2006 and amendments). Det er etablert øvre grense for totalmengden arsen i fôr og fôrmidler. Det er også en fotnote i regelverket som sier at operatøren skal kunne vise at innholdet av uorganisk arsen er under 2 mg/kg. Det er ikke etablert øvre grenser for uorganisk arsen i sjømat eller produkter av sjømat.

Alger har en kompleks kjemi når det kommer til arsenforbindelser. Alger inneholder ofte mer av de organiske arsenforbindelsene kallet arsenoribosider, eller arsensukker (Feldmann and Krupp 2011). Noen alger kan også inneholde høye konsentrasjoner av uorganisk arsen, som for eksempel den brune algen hijiki (*Sargassum fusiforme*) (Taylor, Goodale et al. 2017). Noen arter av andre brunalger har det også blitt vist å kunne inneholde relativt høy andel av uorganisk arsen (Taylor, Goodale et al. 2017).

Den Europeiske komitee for standardisering (CEN) har publisert en metode for bestemmelse av uorganisk arsen i mat og matvarer ved å benytte HPLC-ICPMS (EN 16802:2016). Metodens prinsipp er å bestemme uorganisk arsen som summen av arsenitt (As(III)) og arsenat (As(V)) ved å benytte HPLC koblet til ICPMS. Innen den instrumentell analysen blir prøven ekstrahert ved sur oppslutning, og As(III) blir oksidert til As(V) ved å benytte hydrogenperoksid i ekstraksjonsløsningen. Uorganisk arsen kan på denne måten bli bestemt som As(V) ved å benytte anionbytter HPLC-ICPMS¹. Ved analyser av alger, har det vært mistanke om interferenser med andre arsenforbindelser i analysemetoden. Formålet med denne delarbeidspakken var å sikre at den anvendte analysemetode optimeres slik at bestemmelsen av uorganisk arsen blir korrekt og det ikke er interferens fra andre arsenforbindelser ved analyse av makroalger og tare.

¹ Væskekromatografi koblet til et induktivt koblet plasma massespektrometer.

2. Prosjektgjennomføring

Den analytiske metoden for bestemmelse av uorganisk arsen (EN 16802:2016) baserer seg på en separasjon av arsenforbindelser ved bruk av ionebytterkromatografi. Det benyttes en anionbytter HPLC kolonne, som binder til seg anioner, som arsenat ($\text{As}(\text{O}^-)_3$). I metoden benyttes er en isokratisk mobilfase som gir en separasjon av uorganisk arsen fra andre organiske arsenforbindelser, med en analysetid på totalt 8 minutter. Utfordringen med korte og effektive metoder vil være å få separert uorganisk arsen fra organiske arsenforbindelser i prøvetyper som inneholder en høy andel organiske arsenforbindelser, og særlig når prøvetypen inneholder andre former for organiske arsenforbindelser enn arsenobetaine. Alger og tare kan inneholde en større andel arsensusker, og noen av disse forbindelsene kan potensielt elueres i samme område som retensjonstiden til uorganisk arsen.

For å optimere analysemetoden slik at bestemmelsen av uorganisk arsen blir korrekt, og for å forsikre at det ikke er interferens fra andre arsenforbindelser, ble det vurdert og testet ut ulike fremgangsmåter;

1. *Bruk av andre kromatografiske prinsipper for separasjon av uorganisk arsen*

Det ble undersøkt hvordan arsenforbindelsene i tareprøver ble separert på HPLC kolonner basert med andre separasjonsprinsipper, både kationbytter kromatografi og omvendt-fase kromatografi. Formålet var å undersøke om ekstrakter av tareprøver som hadde høye konsentrasjoner av uorganisk arsen (9 – 11 mg/kg tørrvekt²) kunne inneholde organiske arsenforbindelser, som muligens ble holdt igjen på en HPLC kolonne med annen type stasjonærfase.

2. *Fraksjonering av uorganisk arsen topp, og analyse med HR-MS*

Det ble fraksjonert ut topper av uorganisk arsen fra tareprøver ved å samle opp eluted i retensjonstidsvinduet til uorganisk arsen når analyseres for uorganisk arsen². Formålet var å analysere disse fraksjonene for arsenforbindelser med høyoppløselig massespektrometri (HR-MS).

3. *Bruk av gradient-eluering og anionbytter kromatografi*

Den isokratiske metoden for uorganisk arsen ble videreutviklet fra å være en isokratisk metode til en gradient-elueringsmetode der separasjonen baserer seg på to ulike mobilfaser. Formålet var å få en mer gradvis separasjon av arsenforbindelsene slik at separasjon av uorganisk arsen ble forbedret.

3. Oppnådde resultater og diskusjon

1. *Bruk av andre kromatografiske prinsipper for separasjon av uorganisk arsen*

Utvalgte tareprøver som ved tidligere analyser hadde vist høye nivå av uorganisk arsen, samt prøver som hadde vist at den kromatografiske toppen for uorganisk arsen var asymmetrisk, ble analysert ved å benytte andre kromatografiske prinsipper for separasjonen. Resultatene fra disse analyser viste at arsenforbindelsene i ekstraktene ikke ble holdt tilbake på en kationbytter-kolonne. Det var dermed ikke mulig å verifisere om det var andre organiske arsenforbindelser i toppen for uorganisk arsen ved å benytte denne fremgangsmåten. Lignende resultater ble oppnådd når ekstraktene ble analysert med omvendt-fase kromatografi, der det var dårlig separasjon av uorganisk arsen og arsenobetaine. Det ble fra forsøkene konkludert med at disse kromatografiske prinsippene var lite egnet for å separere uorganisk arsen fra andre organiske arsenforbindelser.

2. *Fraksjonering av uorganisk arsen topp, og analyse med HR-MS*

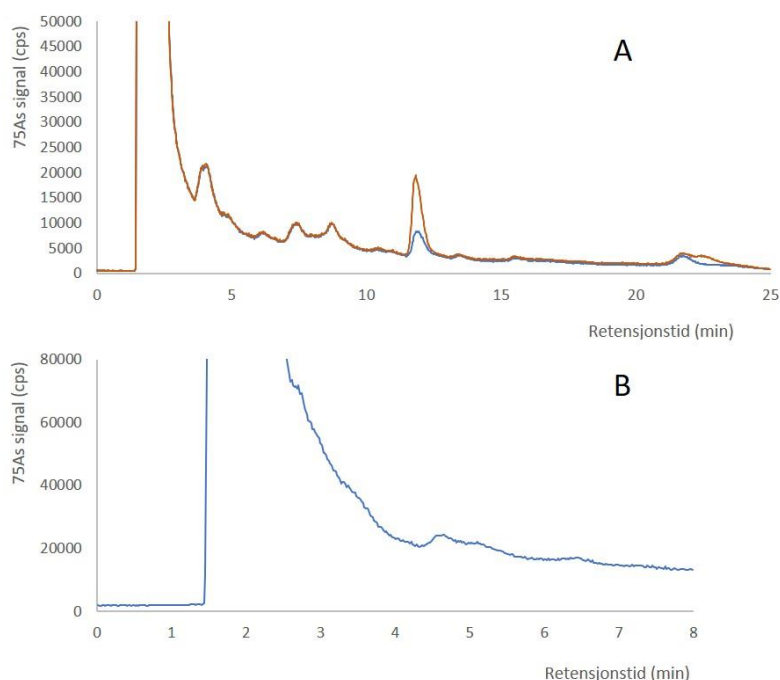
Fraksjoneringen av uorganisk arsen topp ble utført for utvalgte tareprøver med høye konsentrasjoner av uorganisk arsen. Men HR-MS analysene ble ikke utført som planlagt. Det var både analytiske og praktiske utfordringer som var grunnen til dette. Det var utfordringer med å få tilgang på

² Bestemt ved å benytte CEN metode (EN 16802:2016).

instrumentet, samt at fraksjoner inneholder salter fra den ioniske kromatografiske separasjonen som kan forårsaker utfordringer ved analyse med elektropray MS. Det ble ut fra dette bestemt å heller fokusere på å optimalisere den nåværende analysemetoden for bestemmelse av uorganisk arsen i tare. Dette var mer hensiktsmessig med tanke på å kunne implementere en rutinemetode for uorganisk arsen bestemmelse i tare.

3. *Bruk av gradient-eluering og anionbytter kromatografi*

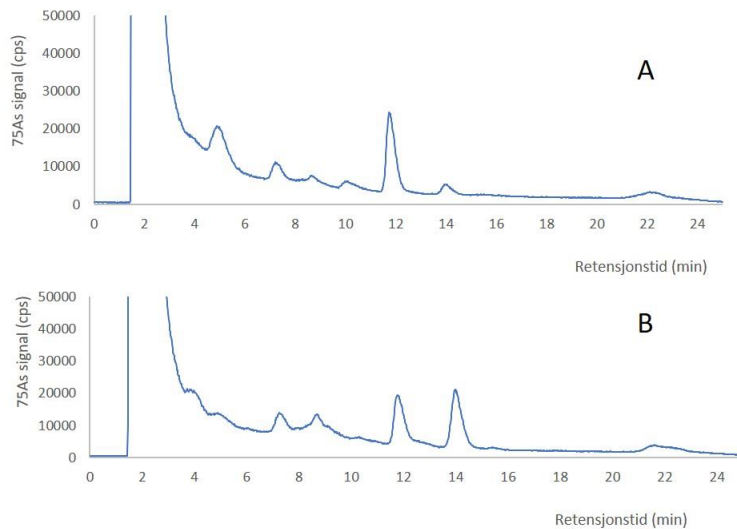
Med utgangspunkt i CEN metoden for uorganisk arsen, ble denne videreutviklet fra å være en isokratisk metode til å benytte en gradient eluering. Ved å benytte to mobilfaser; 3% MeOH (A) og 60 mM ammonium karbonat, pH 9.3 (B), ble separasjonen av uorganisk arsen forbedret. Gradient-elueringen startet på 20% innblanding av mobilfase B, som ble gradvis økt til 100% innblanding av B ved 18 min. Etter 20 min ble igjen mengde mobilfase B redusert til 20% innblanding. Analysetiden ble totalt forlenget til 25 minutter. Metoden gav en tydelig forbedret separasjon av uorganisk arsen fra de andre organisk arsenforbindelsene i tare (Figur 1A og 1B).



Figur 1. Et HPLC-ICPMS kromatogram av grisetang når analysert med gradient-eluerings metoden (A); topp for uorganisk arsen er ved r.t. 11 min, her vist ved å tilsette uorganisk arsen standard (rød linje) til prøveekstraktet (blå linje). Til sammenligning er samme prøve analysert med den isokratiske standard metoden for bestemmelse av uorganisk arsen (B); topp for uorganisk arsen er ved r.t. 4.5 min.

Metoden ble videre benyttet for å bestemme uorganisk arsen i ulike tareprøver der det hadde vært erfaringsmessig utfordrende å definere den kromatografiske toppen til uorganisk arsen ved bruk av CEN metoden. Resultatene viste at flere av disse tareprøvene inneholdt en rekke arsenforbindelser som eluerte nær toppen for uorganisk arsen, som for eksempel sukkertare og grisetang (Figur 2A og B). Ettersom ICP-MS ikke gir noen informasjon om den kjemiske strukturen til forbindelsene, så har ikke disse arsenforbindelser blitt identifisert. Det arbeides nå med å validere den utviklede gradientmetoden for uorganisk arsen. Resultatene viser så langt god presisjon for bestemmelse av

uorganisk arsen med RSD(%) under 10% for sertifiserte referansemateriale, in-house referansemateriale og ulike algeprøver (n = 5) ved analyse på ulike tidspunkt (n = 6). Resultatene for uorganisk arsen for det sertifiserte referansematerialet B211 (ris, NIST) er på $129 \pm 8 \mu\text{g}/\text{kg}$ (n=6) som er nær den sertifiserte verdien på $124 \pm 11 \mu\text{g}/\text{kg}$. Det er dessverre ikke mulig på nåværende tidspunkt å få tak i sertifiserte referansematerialer av tare som er sertifisert for uorganisk arsen. Videre arbeid vil fokusere på å sammenligne metoden og resultatene ved utførelse av analysene ved både HI og DTU i Danmark.



Figur 2. Sukkertarer (A) og Blæretang (B) analysert for uorganisk arsen med gradient-elueringsmetoden. Uorganisk arsen eluerer ved retensjonstid 12 min.

Konklusjon

Det har blitt utviklet en analysemetode som baserer seg på gradient-eluering anionbytter HPLC-ICPMS. Metoden viser en forbedret separasjon av uorganisk arsen i komplekse prøver som tang og tare. Det er startet en valideringsprosess av metoden, og videre arbeid vil bl.a. fokusere på å sammenligne metoden og resultatene ved utførelse av analysene ved både HI og DTU i Danmark.

Delarbeidspakke 1.2. Optimalisering og validering av analysemetode til bestemmelse av jod i alger

Problemstilling og formål

Makroalger inneholder generelt mye jod, og noen tarearter har svært høye konsentrasjoner, rundt 4 000 mg/kg tørrvekt eller ca 700 mg/kg våtvekt. Med en anbefalt øvre grense for daglig inntak av jod på 600 µg bør man i teorien ikke innta mer enn under ett gram tørket tare per dag. Et høyt inntak av jod påvirker skjoldbruskkjertelens funksjon og kan forårsake hypotyreose eller hypertyreose. I enkelte tilfeller er det også vist økt forekomst av jod-indusert struma. Personer med en normalt fungerende skjoldbruskkjertel kan i utgangspunktet håndtere et jodinntak på omkring 1 mg/dag over flere måneder, mens andre igjen vil få hypotyreose eller hypertyreose bare ved et inntak på 0.3 mg/dag; altså et jodinntak som er på 2 ganger lavere enn daglig anbefalt inntak.

De fleste analyser av sporelementer i biologiske prøver kan gjøres ved bruk av ICPMS etter syreoppslutning av prøven. Dette gjelder ikke for jod som i sur oppløsning vil danne en flyktig forbindelse hydrogeniodid (HI). Derfor er de fleste metoder til bestemmelse av jod basert på en alkalisk ekstraksjon. Jod kan være potensielt ustabil, og denne ustabiliteten av jod i både prøvemasse og i løsning har vært grunnlag for diskusjon av jod-data.

For å kunne vurdere inntaket og dermed eksponering til jod er det viktig å ha kvalitetssikrede analytiske data. Det primære formål med denne delarbeidspakke var å sikre at analysemetoden for bestemmelse av jod i alger er etablert og validert, slik at kvalitetssikrede og troverdige data kan oppnås i prosjektet. I tillegg var formålet å undersøke stabiliteten av jod i biomasse og i ekstrakter bli nærmere undersøkt.

Gjennomføring

Jod ble bestemt i alger ved å anvende en metode som er utviklet og valideret ved DTU. Metoden baseres på basisk ekstraksjon ved bruk av TMAH (tetramethylammonium hydroxide) og deretter bestemmelse av jod i ekstraktet ved bruk av ICP-MS, ved bruk av ekstern kalibrering og med intern standard. Metoden ble i 2017 godkjent som europæisk standard for analyse av jod i animalske fôrprodukter (EN17050:2017) (CEN 2017). I den sammenheng ble metoden testet for analyse av et taremél (som fôringrediens) med gode resultater. For å kvalitets sikre analyseresultatene er det vanlig å inkludere et sertifisert referansemateriale i analysen. I 2018 kom det første algebaserte referansemateriale med sertifisert verdi for jod på markedet fra National Institute of Standards and Technology (NIST). Dette materiale har navnet SRM 3232 kelp powder og er basert på et pulver av laminaria. Både DTU og HI har anskaffet dette materiale og anvendt det i analysene av jod i tang og tare. Disse analyser har bekreftet at den anvendte metodeprinsipp i EN17050:2017 gir korrekt resultat. Tilgjengeligheten av en standardmetode og et sertifisert referansemateriale for jod som kunne verifisere korrektheten av jod-analysene gjorde at det planlagte eksperimenter med NAA (Neutron Activation Analysis) blev nedprioritert. I stedet for blev det besluttet å anvende ressursene på et studie av stabiliteten av jod i tare og i tare-ekstrakt. Disse forsøk har til formål å bidra med viktig og ny informasjon om stabiliteten av jod i tare og tare-ekstrakt og gi informasjon relatert til oppbevaring av tare-prøver og -ekstrakter.

Resultater

Stabilitetsforsøkene er beskrevet i delrapport (finnes i appendix, på engelsk). Forsøkene er utført etter de standardiserte prinsippene i (Lamberty, Schimmel et al. 1998) som anvendes til å dokumentere

stabiliteten av referansematerialer. Forsøket ble satt opp som angitt i nedenstående tabell med variasjon av temperatur, tid og prøvetype (se appendix for ytterligere detaljer).

Temperatur	Time	Type of sample
<ul style="list-style-type: none"> • F → på frys (−20 °C) • R → rom T (approx. 20 °C) • H → høy T (60 °C) 	<ul style="list-style-type: none"> • 3W → 3 uker • 5W → 5 uker • 8W → 8 uker • LP → lengre periode (6 months) 	<ul style="list-style-type: none"> • SB → biomasse • EW → ekstraksjon i vann • EAc → ekstraksjon i syre • EAl → ekstraksjon i base

I løpet av forsøket ble prøvene etter endt behandling satt på frys (referansepunkt) og samlet sammen til analysen, som ble utført isokronisk for å minske eventuelle usikkerheter fra selve analysen.

Alle jod analyser er utført på DTU ved bruk av EN17050:2017 metoden.

Resultanene viste:

- Jodinnholdet i biomasse som ble eksponert for forskjellige temperaturer og tid var stabilt i de 8 uker som forsøket varte. Resultatene tyder dermed på at tørr biomasse kan oppbevares ved romtemperatur over lengre tid uten at jodinnholdet minker, eller blir påvirket.
- Jodinnholdet i forskjellige ekstrakter (vann, syre og base) oppbevart ved forskjellige temperaturer og tid i lukkede beholdere var stabilt over de 8 uker i forsøket, men også helt opp til 6 måneder. Dette betyr at ekstrakter kan oppbevares i lukkede beholdere uten tap av jod over lengre tid.
- Ved oppbevaring av syreekstrakter med åpne beholdere skjer et tap av jod (opp til 30% tap over 2 uker). Det skjer et større tap av jodid (I-) enn jodat (IO₃-) i syreekstrakter.

Konklusjoner

- En metode til bestemmelse av jod i tang og tare er identifisert (EN17050:2017). Metoden har vist at gi troverdige resultater for analyse av jod i tare. Metoden er utviklet på DTU og implementert på både DTU og HI.
- Et sertifisert referansemateriale av en brunalge (SRM3232, Laminaria) med sertifisert verdi for jod er identifisert og anskaffet. Analyser av dette materiale med EN17050 viser at metoden gir korrekte resultater for denne prøvetype.
- Systematiske isokroniske forsøgg over 8 uker blev gjennomført for at undersøke stabiliteten av jod i alge biomasse og alge ekstrakter. Resultatene viste at jod i biomasse er ganske stabilt og tørt tarepulver kan oppbevares i lengre tid uten tap. Jodinnholdet i tareekstrakt er stabilt, så lenge beholdere er lukket, mens i åpne beholdere vil det skje et tap av jod for syre ekstrakter.

Referanser:

CEN (2017). "Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of iodine in animal feed by ICP-MS."

EFSA (2009). "Scientific Opinion on Arsenic in Food." EFSA Journal **7**(10).

EFSA (2014). "Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population." EFSA Journal **12**(3).

Feldmann, J. and E. M. Krupp (2011). "Critical review or scientific opinion paper: Arsenosugars-a class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs?" Analytical and Bioanalytical Chemistry **399**(5): 1735-1741.

Lamberty, A., H. Schimmel and J. Pauwels (1998). "The study of the stability of reference materials by isochronous measurements." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **360**(3): 359-361.

Taylor, V., B. Goodale, A. Raab, T. Schwerdtle, K. Reimer, S. Conklin, M. R. Karagas and K. A. Francesconi (2017). "Human exposure to organic arsenic species from seafood." Sci Total Environ **580**: 266-282.

Appendix:

- Ana Jerse, Report on investigation of stability of iodine in seaweed biomass and seaweed extracts, DTU Food, 2019.